

Etude des sécrétions protéiques et enzymatiques du *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, agent causal du Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier

Amraoui H.¹, Sedra My H.², Hamdaoui A³.

¹Fac. sciences et techniques, Lab. sciences végétales appliqués, Département de Biologie,
BP 618, Marrakech Maroc.

²INRA, Lab. Phytopathologie, Génétique et de Lutte Intégrée- Unité de Recherche de Protection des Plantes, Centre Régional de Marrakech, BP533.40000 Marrakech Maroc.

³Faculté des sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Laboratoire de biochimie, Département de Biologie. Marrakech, Maroc

ملخص

تبين هذه الدراسة أن الفطر المسبب لمرض الفوزاريوم الوعائي للنخيل (البيوض) *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* باستعمال الناقل الكهربي (PAGE-SDS)، تمكننا من معرفة أشرطة بروتينية في الرشاحة المركزة لزراعة الفطر. تتغير الكتل المولية لهذه البروتينات بين 65 إلى 13 Kda باستعمال الناقل الكهربي. كذلك حصلنا على نفس الصورة الجانبية لثلاث عزلات طفيلية للفوزاريوم اوكسيسبوروم من أصل مختلف بينما حصلنا على صورة جانبية مخالفة لعزلة غير طفيلية من نوع الفوزاريوم اوكسيسبوروم. أظهرت معايرة الانزيمات في الاوساط الزراعية نشاطين، بكتنوليتيك (*pectinolytic activity*) وسيليلوتيك (*cellulolytic activity*) مهمين مع الإشارة أن النشاط البروتوليتيك ضعيف. تطرقنا كذلك الى دراسة تأثير *pH* وبعض الحواجز والحرارة على هذا النشاط الانزيمي.

الكلمات المفتاحية : الفوزاريوم اوكسيسبوروم البيدنس، البيوض، بكتناز سليلاز، بروتياز

Résumé

Dans cette étude, nous avons démontré que l'agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier (*Fusarium oxysporum f.sp albedinis*) sécrète dans le milieu extra-cellulaire une quantité importante de protéines. Par électrophorèse (PAGE-SDS), nous avons identifié 8 bandes protéiques dans les filtrats concentrés de culture de champignon. Les masses moléculaires de ces protéines varient de 65 à 13 Kda. Le même profil électrophorétique est obtenu pour 3 isolats pathogènes du *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* d'origine différente. Par contre, un profil différent est obtenu pour un isolat saprophyte de *Fusarium oxysporum*. Les dosages enzymatiques ont révélé dans ces filtrats de culture une importante activité pectinolytique et cellulolytique mais une faible activité protéolytique. L'influence du *pH*, de quelques inhibiteurs et de la chaleur sur ces activités enzymatiques a été également étudiée.

Mots clés : *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* , Bayoud, Pectinase Cellulase, Protéase

Abstract

In this study, we have demonstrated that the causal agent of date palm wilt (*Fusarium oxysporum f.sp albedinis*) secretes in the extra cellular medium an important quantity of proteins. By electrophoresis (PAGE SDS), we have identified 8 proteic bands in the concentrated filtrates of fungi culture. Molecular masses of these proteins vary from 65 to 13 Kda. The same electrophoretic profile is obtained for 3 pathogen strains of the *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* witch are from different origin. In the other hand, different profile is obtained for saprophyte strain of *Fusarium oxysporum* tested. Enzymatic dosages have revealed in these culture filtrates an important pectinolytic and cellulolytic activities but weak proteolytic activity. The influence of the *pH*, some inhibitors and the heat on these enzymatic activities is studied.

Key watds : *Fusarium oxysporum f.sp.albedinis*, Bayoud clisease, Pectinase, Celluluse, Protease.

Introduction

Plusieurs micro-organismes phytopathogènes sécrètent des toxines et des enzymes hydrolytiques actives contre les structures tissulaires de la plante hôte. Il s'agit principalement des cellulases et des pectinases dont le rôle dans la pathologie fongique a été discuté depuis plusieurs années. Des travaux ont montré que ces hydrolases étaient capables de dégrader *in vitro* les composés cellulosiques et pectiques (2,8,11,18). Ce sont les substrats respectifs des cellulases et des pectinases. Ainsi Deese et al (7) avaient suggéré que les cellulases et pectinases de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* soient responsables de la dégradation de la pectine et de la cellulose ; composés essentiels de la paroi primaire et de la lamelle moyenne de la cellule végétale en fragments solubles, ce qui entraîneraient l'obstruction des vaisseaux. De même, des études histologiques et de digestions enzymatiques réalisées par Belarbi et al (3) ont révélé des altérations tissulaires chez le palmier dattier infecté pouvant impliquer des hydrolases principalement les cellulases pectinases et même les protéases puisque ces dégradations concernent les polysaccharides, pectine et les protéines des tissus cellulaires de l'aérenchyme du palmier dattier. Dans ce travail, nous allons dans une première partie étudier les sécrétions protéiques du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* dans le milieu extracellulaire, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Dans une seconde partie nous chercherons, par des dosages enzymatiques, dans les filtrats de culture des activités cellulases, pectinase et protéases.

Matériel et méthodes

Trois isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* d'origine géographique différente et un isolat saprophyte de *Fusarium oxysporum* ont été utilisés. Le tableau I donne le code attribué à chacun des isolats ainsi que ces caractéristiques. L'isolat "133" a été essentiellement étudié du fait qu'il a déjà montré une grande agressivité vis-à-vis des plantules du palmier dans les tests d'inoculation expérimentale (21).

Tableau I. Caractéristiques des différents isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* utilisés.

Code de la souche	Variété de palmier dattier ou de substrat	Origine	Date d'isolement	Substrat de conservation
Foa133	Jihel	Drâa	1986	Sable
Foa 44	Mejhoul	Tafilelt	1981	-
Foa 50	Boufeggous	Zagora	1983	-
ZC	sol de palmeraie	Zagora	1985	-

Culture du champignon en milieu liquide et obtention des filtrats :

La culture est effectuée sur un milieu Czapeck modifié dont la composition est donnée dans le tableau 2. Le milieu de culture est réparti dans des erlens de 250 ml à raison de 200 ml /erlen, qui sont auto-clavés à 120°C pendant 20 min Le pH du milieu est ajusté à 5 par l'acide ortho-phosphorique, avant sa stérilisation. Les erlens contenant le milieu de culture sont ensemencés

par une suspension de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* de concentration estimée auparavant par la cellule de Mallassez. Ces erlens sont ensuite déposés sur une table d'agitation réglée à 80 tours par minute à la température ambiante du laboratoire. Après un temps déterminé (2, 4, 6, 8 et 10 jours) deux erlens sont prélevés. On procède à l'estimation de la concentration en spores par ml du milieu à l'aide de la cellule de malassez après quoi, on filtre ce milieu sous vide à travers un papier filtre wattman n°1. Le filtrat obtenu est enfin centrifugé pendant 20 min à 7000 tours par min Le surnageant obtenu est ensuite purifié par concentration en utilisant deux techniques qui dépendent du volume initial et du volume final désiré. Il s'agit de la concentration par ultrafiltration sur membrane sélective et sous pression d'azote ainsi que la concentration sur membrane sélective par centrifugation (dans des centricons. Le filtrat concentré obtenu sera utilisé dans toutes les études ultérieures.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

La technique d'électrophorèse utilisée est celle décrite par Laemmli (14). Le gel de migration (8x8x0,1cm) est constitué d'un gel de résolution continu à 12,5% (rapport acrylamide /bis acrylamide 30/0,8) dans un tampon tris Hcl 375mM; pH 8,6 et d'un pré gel de concentration à 5% en polyacrylamide dans un tampon tris Hcl 125mM pH 6,8. Les deux gels renferment 0,1% de sodium dodécyl sulfate (SDS). La polymérisation du gel est amorcée par le persulfate d'ammonium et accélérée par le TEMED (NNN'N' tétraméthyletylénédiamine). Avant d'être déposé sur le gel ; l'extrait à tester est additionné d'une solution de dénaturation renfermant du tris Hcl 10_M, pH 6,8 SDS1% bmercaptoethanol 100mM, bleu de bromophenol 0,05%(marqueur de migration) ainsi que 30% de glycérol afin de faciliter les dépôts. Ce mélange est porté à ébullition pendant 5 min La migration est réalisée à 120 volts dans un tampon tris Hcl 25mM, glycine 192mM, SDS, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas du gel (45 min environ). Après électrophores, le gel est démoulu puis coloré pendant 3 heures dans une solution aqueuse renfermant du méthanol - acide acétique et du bleu de coomassie R250 (25 - 10 - 0,1%). Une agitation légère est maintenue constante tout le long de la coloration. Ce gel est ensuite rincé par de l'eau distillée puis décoloré dans le même mélange dépourvu du bleu de coomassie jusqu'à visualisation des bandes.

Techniques utilisées pour les dosages protéiques et enzymatiques

Avant de passer aux dosages enzymatiques dans les filtrats de culture concentrés, on cherche tout d'abord la quantité de protéines totales existant dans ces filtrats de culture en utilisant la technique décrite par Bradford (4).

Dosage des activités cellulase et pectinase :

Le dosage de l'activité cellulolytique et pectinolytique a été effectué selon la technique décrite par Miller (16). C'est une technique qui permet de quantifier les sucres réducteurs libérés dans le milieu réactionnel. Les substrats utilisés sont respectivement la carboxyméthylcellulose et l'acide polygalacturonique pour les cellulases et les pectinases. Le milieu réactionnel est composé de 500ml de substrat dissous dans du tampon citrate phosphate 0,1M pH 5 et de 50 ml de

l'extrait enzymatique à tester. Après homogénéisation ; les tubes sont déposés dans une étuve réglée à 37°C pendant 6 heures. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 2 ml du réactif à l'acide dinitrosalicylique (préparé en mélangeant à 60°C 1 g d'acide dinitrosalicylique "DNS", 20ml de NaOH 2N et 50ml d'eau distillée). Après solubilisation complète du DNS, on ajoute 30 g du tartrate double Na-K en petites quantités. Le mélange se fait à 50°C. Le volume final est ramené à 100ml par de l'eau distillée. Ces tubes sont portés à ébullition pendant 5 min. Après refroidissement, l'absorbance à 540 nm est déterminée contre un blanc dont le quel l'extrait enzymatique est remplacé par du tampon citrate phosphate 0,1M pH5. L'activité enzymatique est déterminée après soustraction de l'absorbance du témoin, à l'aide d'une courbe étalon établie avec du glucose à différentes concentrations allant de 0 à 50µg. Elle est exprimée en unité internationale (UI) par ml. Une unité internationale correspond à la quantité de micro moles de sucres réducteurs libérés par min

Dosage des protéases :

Il s'effectue dans un milieu réactionnel composé de 50µl d'extrait enzymatique et de 500ml d'une solution d'azocaséine (substrat général de toute activité protéolytique) à 2% dans un tampon citrate phosphate pH6. Le volume final du milieu réactionnel est de 1 ml. Après leur homogénéisation ; les tubes eppendorf sont placés pendant 6 heures à 37 °C. On arrête la réaction enzymatique en ajoutant 5% d'acide trichloroacétique (TCA.) Après centrifugation dans une mini centrifugeuse, l'absorbance à 405nm des surnageants est mesurée contre un blanc incubé dans les mêmes conditions dans le quel l'extrait enzymatique est remplacé par 50ml de tampon citrate phosphate 0,1 M pH 6.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de 4 à 5 échantillons en fonction des échantillons avec l'écart type.

Résultats

Cinétique d'apparition des protéines et des enzymes dans les filtrats de culture concentrés :

La culture du champignon (Foa isolat" 133") a été effectuée dans le milieu Czapeck modifié et arrêtée à différents stades de croissance (4,7, 10 et 13 jours). La figure 1 montre que la concentration en protéines totales augmente quand la durée de culture du champignon augmente. Cette quantité de protéines augmente surtout entre le 7ème et le 10ème jour de culture. Un profil analogue est obtenu pour les activités cellulolytiques, pectinolytiques et protéolytiques (figures 2A,2B,3).

Une analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12,5%) en présence de SDS a montré (figure 4) que les protéines ne commencent à être visualisées qu'à partir du 7ème jour de croissance (voir b) avec une augmentation progressive de l'intensité en allant du 7ème au 13ème jour de culture. Ce qui va dans le même sens que les résultats de dosages des protéines totales (figure 1). Nous avons dénombré 8 bandes protéiques que nous avons dénommées PsFoa (protéine sécrétée par Foa) et numérotées de 1 à 8 dans l'ordre des PM décroissants. En utilisant la relation entre la mobilité relative (Rm) des protéines de référence et leur PM, nous

avons déterminé un PM moyen pour chacune de ces protéines (tableau II). Leur PM varie de 65 à 13 Kda.

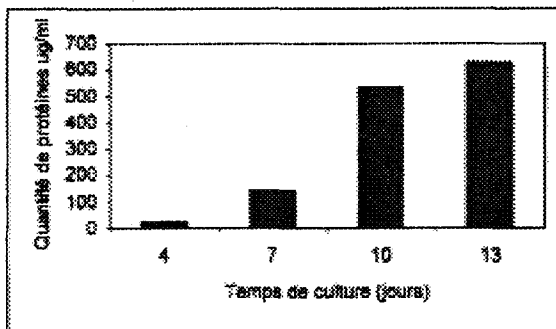


Figure 1: Cinétique d'apparition des protéines dans les filtrats de culture.

Les milieux de culture czapeck modifié ont étéensemencé par la même quantité de suspension de *Foa* "133". Après 4,7, 10 et 13 jours, les cultures sont récupérées. les milieux sont soumis à une filtration, une centrifugation et une concentration de la même manière. Le dosage des protéines totales (Bradford 1976) est effectué sur les filtrats concentrés.

Tableau II. Composition des milieux de culture liquides (les quantités sont données pour 1 l de milieu).

Milieu de Richard	Milieu Pomme de terre-Dextrose	Czapeck	Czapeck modifié
KNO ₃ 10g	Pomme de terre.....250g	NaNo ₃ ...2g	NH ₂ PO ₄ ..2,25g
KH ₂ PO ₄5g	Glucose(Dextrose)....20g	Kcl.....1g	
MgSO ₄ 2,5g	--	MgSO ₄ 7H ₂ O.....0,5g	
Fecl ₃0,02g	--	FeSO ₄ 7 H ₂ O.....0,5g	
Sucre de canne 50g	--	Saccharose30g	

Tableau III : Identification des protéines sécrétées par l'isolat *Foa*133 et estimation de leurs poids moléculaires respectifs à travers les migrations électrophorétiques effectuées dans les différentes conditions

Protéines sécrétées	Poids moléculaires estimé
PsFoa	65 Kda
PsFoa	60 Kda
PsFoa	35,5 Kda
PsFoa	31 Kda
PsFoa	23 Kda
PsFoa	18 Kda
PsFoa	16 Kda
PsFoa	14 kda

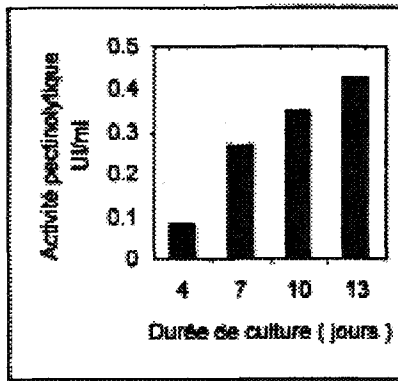
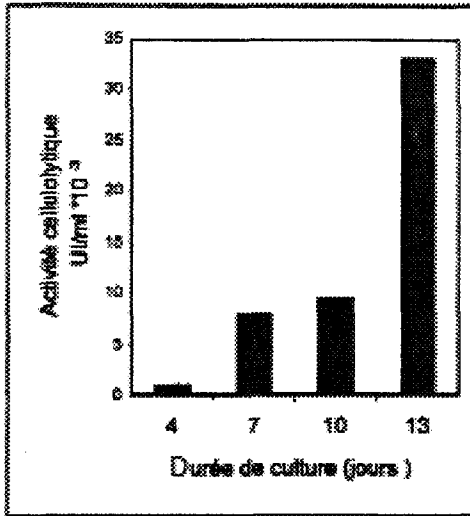


Figure 2: Cinétique d'apparition des activités enzymatiques dans les filtrats de culture.

Le dosage des activités enzymatiques a été effectué sur les filtrats concentrés, le pH du milieu réactionnel est de 4.5. Les substrats utilisés pour le dosage de l'activité cellulolytique et pectinolytique sont respectivement la carboxyméthyl cellulose à 0,5% et le polypectate de sodium à 0.15 %. La même quantité de filtrat concentré (50ml) a été incubée avec le substrat pendant 6 heures à 37°C.

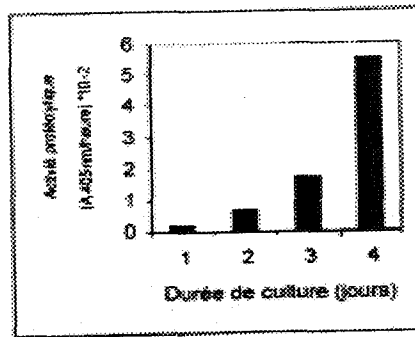


Figure 3 : Cinétique d'apparition de l'activité protéolytique dans les filtrats de culture.

Le dosage de l'activité protéolytique a été effectué sur les filtrats concentrés, le pH du milieu réactionnel est de 6. Le substrat utilisé est l'azocaséine à 2%. Le temps d'incubation à 37 °C du substrat avec la filtrat concentré est de 6 heures.

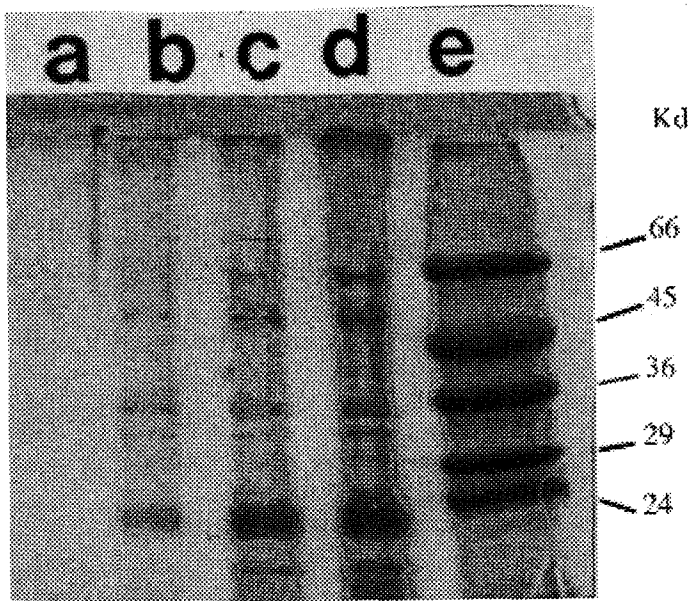


Figure 4 : Cinétique d'apparition des protéines dans les filtrats de culture de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa133).

Profil électrophorétique PAGESDS;12.5% après 4 jours (a), 7 jours(b), 10 jours(c) et 13 jours(d) de croissance de champignon. Les poids moléculaires indiqués correspondent à ceux des protéines de référence (e).

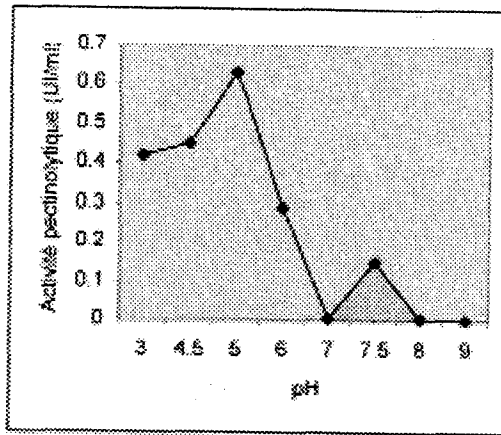


Figure 5 : Etude de l'activité pectinolytique en fonction du pH du milieu réactionnel.

Les filtrats de culture obtenus après 15 jours de culture du Foa "isolat 133", ont été concentré de la même manière que précédemment. Les mêmes volumes de filtrats concentrés (50 μ l) ont été incubé à 37 °C pendant 6 heures avec le polypectate de sodium à 0.15 % dans les tampons suivants : Le tampon citrate phosphate 50mM du pH 3 à pH 7; le tampon tris-HCl 50 mM pour le pH 7.5 et le tampon acide borique-borate 50mM pour les pH8 et 9 .

Caractérisations préliminaires des activités pectinolytiques, cellulolytiques et protéolytiques des filtrats de culture :

Activité pectinolytique

Etude de l'activité enzymatique en fonction du pH du milieu réactionnel :

Le filtrat de culture concentré a été incubé à 37 °C avec le substrat (polypectate de sodium à 0,15 %) dans des milieux tamponnés à différents pH allant de 3 à 9. La figure 5 montre que la zone de pH la plus favorable à cette activité enzymatique se situe entre pH 4,5 et pH 6 avec une activité optimale à pH 5.

Effet de la chaleur et de quelques inhibiteurs sur l'activité pectinolytique à pH5:

Nous avons testé l'effet du chauffage pendant 20 min sur les filtrats de culture concentrés. Nous remarquons que 90% environ de l'activité enzymatique est perdue à 60°C. Celle ci est complètement inactivée à 100°C (tableau IV)

Tableau IV : Influence de la chaleur sur l'activité pectinolytique et cellulolytique à pH 5 et sur l'activité protéolytique à pH 6

Température (°C)	Activité		
	Activité pectinolytique	Enzymatique (A.R%) Activité cellulolytique	Résiduelle Activité protéolytique
37	100	100	100
50	31	16	41
60	11	8	36
100	0.2	0.4	1

Nous avons également testé l'effet de quelques inhibiteurs sur cette activité enzymatique. Le tableau V montre que l'EDTA qui est un agent chélateur des métaux n'inhibe que 50% environ de l'activité pectinolytique alors que Hgcl2 qui a la propriété de pouvoir se complexer aux fonctions SH lui fait perdre 90% de son activité.

Tableau V. Effet de quelques inhibiteurs sur l'activité pectinolytique et cellulolytique à pH 5 et sur l'activité protéolytique à pH 6

Inhibiteur (°C)	Activité		
	Activité pectinolytique	Enzymatique (A.R%) Activité cellulolytique	Résiduelle Activité protéolytique
EDTA(1mM)	44	10	58
Hgcl2(1mM)	14	10	0.07
Iodoacétamide(1mM)	-	-	2

Activité cellulolytique :

Etude de l'activité enzymatique en fonction du pH du milieu réactionnel :

La figure 6 montre que la zone d'activité enzymatique se situe entre pH4, 5 et pH 6 avec un optimum à pH5.

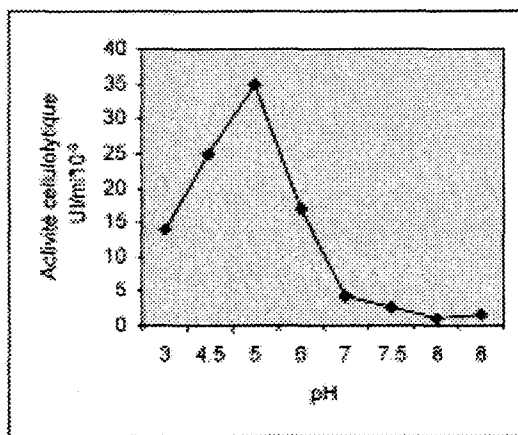


Figure 6: Etude de l'activité cellulolytique en fonction du pH du milieu réactionnel.

Les filtrats de culture obtenus après 15 jours de culture du Foa "isolat 133", ont été concentrés de la même manière que précédemment. Les mêmes volumes de filtrats concentrés (50 µl) ont été incubés à 37 °C pendant 6 heures avec la carboxyméthyl cellulose à 0.5 % dans les tampons suivants : Le tampon citrate phosphate 50mM du pH 3 à pH 7 ; le tampon tris-Hcl 50 mM pour le pH 7.5 et le tampon acide borique-borate 50mM pour les pH8 et 9 .

Effet de la chaleur et de quelques inhibiteurs sur l'activité pectinolytique à pH5 :

Le tableau IV montre que l'activité cellulolytique est inactivée à 90 % quand le filtrat est chauffé à 60°C. Cette enzyme est complètement inactivée quand l'extrait est porté à ébullition. Cette activité cellulolytique est inhibée à 90% par l'EDTA et par HgCl₂ (tableau V)

Aactivité protéolytique :

Effet du pH :

L'activité protéolytique est favorable dans la zone de pH comprise entre 5 et 7 avec un maximum à pH6 (figure 7).

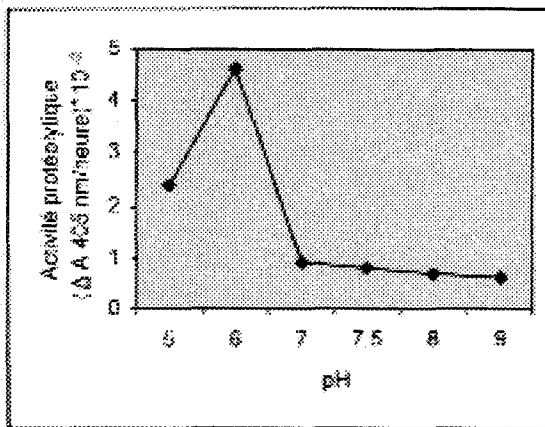


Figure 7: Etude de l'activité protéolytique en fonction du pH du milieu réactionnel.

Les filtrats de culture obtenus après 15 jours de culture de l'isolat Foa 133, ont été concentrés de la même manière que précédemment. Les mêmes volumes de filtrats concentrés (50µl) ont été incubés à 37 °C pendant 6 heures avec l'azocaséine à 2% dans les tampons suivants : le tampon citrate phosphate 50mM du pH 3 à pH 7 ; le tampon tris-Hcl 50 mM pour le pH 7.5 et le tampon acide borique-borate 50mM pour les pH8 et pH9.

Effet de la chaleur et de quelques inhibiteurs

L'activité protéolytique résiduelle n'est plus que de 36% quand l'extrait enzymatique est chauffé à 60°C (tableau IV). L'EDTA a inhibé 50% environ de l'activité enzymatique alors que l'Hgcl₂, l'iodoacétamide ont provoqué une inhibition presque complète de cette activité (tableau V).

Etude comparative entre l'isolat "Foa 133", 2 isolats pathogènes du Foa et un isolat saprophyte :

Nous avons cherché à savoir si le spectre électrophorétique obtenu pour l'isolat Foa "133" se retrouve également chez d'autres isolats du Foa. Pour cela, nous avons testé deux autres isolats du Foa provenant de zones géographiques différentes et montrant une virulence vis à vis du palmier dattier (tableau I) "isolats 44 et 50" et un isolat saprophyte (zc) ne montrant aucun pouvoir pathogène sur le palmier dattier. La figure (8) montre un spectre électrophorétique comparable entre l'isolat 133, 44 et 50. Seule l'intensité des bandes qui diffère, la bande PsFoa est également très marquée. Le profil obtenu pour l'isolat saprophyte est très différent (figure 10 puits d1 et d2) même la bande PsFoa est absente.

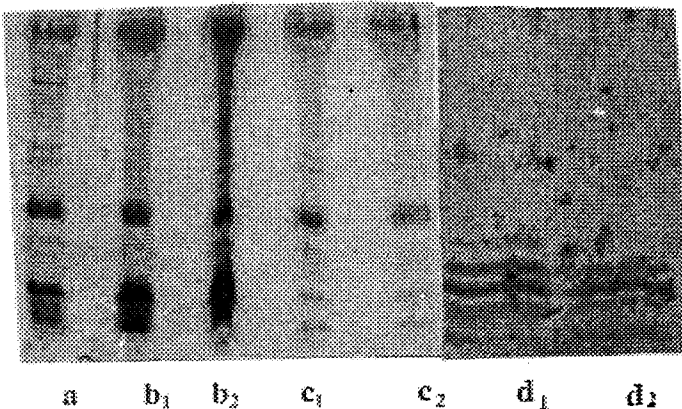


Figure 8 : Etude comparative de deux autres isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa) et d'un isolat saprophyte de *Fusarium oxysporum*.

Profil électrophorétique (PAGE SDS15%). (a) après révélation au bleu de coomassie des filtrats de culture concentrés obtenus après croissance du champignon dans les mêmes conditions de culture : isolat "133" (a), isolat "44" (b1 ; b2) ; isolat "50"(c1 ; c2), isolat "ZC" (d1 ; d2).

Discussion

Dans cette étude nous nous sommes intéressés aux sécrétions de type protéique du *Foa* in vitro. Nous avons pu, par électrophorèse visualiser 8 bandes protéiques de PM allant de 65 à 13 Kd. Ces bandes sont de plus en plus apparentes quand la croissance du champignon augmente ; ceci prouve que ces protéines sont bien sécrétées. Un même profil électrophorétique est obtenu pour 3 isolats de *Foa* différents. On note cependant une légère différence au niveau de la netteté des bandes. Ces dernières ne sont plus visualisées dans le cas de l'isolat du *Fusarium oxysporum saprophyte*, même la protéine que nous avons dénommée PsFoa 5 et qui est très présente pour les autres isolats n'est plus retrouvée. Ceci nous laisse suggérer qu'il existerait une relation entre la pathogénéicité du champignon et la nature des protéines sécrétées. Il serait donc intéressant d'isoler, de purifier et caractériser ces protéines. Nous avons recherché parmi ces protéines les activités cellulolytiques et pectinolytiques. Leur présence dans le cas du *Foa* a été déjà soupçonnée par Dubost et al (10.) Le rôle de ces enzymes dans la pathogénèse a été déjà démontré par plusieurs auteurs dans le cas d'autres *Fusaria*, tel que *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (6,9,13), *F.o. f.sp. cubense* (7) et *Fo f.sp. ciceri* (20). L'activité cellulolytique s'est montrée plus faible que l'activité pectinolytique ; ceci peut s'expliquer soit par le fait que le substrat que nous avons utilisé (carboxyméthylcellulose) pourrait être non spécifique aux types de cellulases sécrétées par le *Foa* in vitro. En effet ce substrat n'est spécifique que des endoglucanases (12) ; ou alors que les cellulases n'auraient qu'un rôle secondaire dans la genèse des symptômes de flétrissure comme l'a suggéré Meyer (15). L'activité pectinolytique est maximale à pH 5. Ce même pH est retrouvé dans le cas des pectinases sécrétées par *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* (20). Nous pouvons supposer que le *Foa* sécrète dans le milieu extérieur un mélange de pectinases dont l'une correspondrait aux poly-galacturonase (pg) comme l'a suggéré Cooper et al. (6) qui avait spécifié que le pH 5 était le pH optimal des polygalacturonases de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Les cellulases et pectinases mises, en évidence dans les filtrats de culture peuvent jouer un rôle important dans la pathogénèse. Ainsi, et selon Deese et Stahmann (7,8) quand le champignon (*Fo. f.sp. cubens*) envahi le système vasculaire de la plante il produit des enzymes cellulolytiques et pectinolytiques. Celles ci seraient responsables de la dégradation des composés pectiques qui forment la paroi primaire et la lamelle moyenne de la cellule végétale, et donc de la libération de fragments larges dans les vaisseaux. De même les cellulases pourraient dégrader initialement, le complexe lignine-cellulose, en libérant dans un premier temps des composés de haut poids moléculaire, responsables de l'obstruction des vaisseaux, et de molécules suffisamment petites, utilisées pour la nutrition du champignon, dans un second temps. Selon Ortega (18), ces enzymes sécrétées par *Fo f.sp. lycopersici*, auraient un rôle dans la désintégration de la paroi de la cellule - hôte; ce qui faciliterait la pénétration de l'agent pathogène. Paquin et al (19) avaient également établi une corrélation entre la synthèse d'enzymes pectiques et la virulence de *Fo f.sp. lycopersici*. Dans le cas de *Foa*, Belarbi et al. (3), ont montré par des tests histochimiques et de digestions enzymatiques que les tissus cellulaires de l'aerenchyme du palmier dattier étaient composés essentiellement de pectine et de polysaccharides. Ces derniers étant les substrats respectifs des pectinases et des cellulases ; ce qui justifie la sécrétion des cellulases et des pectinases par le *Foa* in vitro, ainsi que leur rôle dans la toxicité du champignon.

Belarbi et al. (3), ont également signalé que les tissus cellulaires de l'aerenchyme des cellules hôtes étaient composées de protéines. Ceci nous laisse suggérer qu'il existe une éventuelle activité protéolytique parmi les sécrétions protéiques du *Foa*. En effet, nous avons mis en évi-

dence une activité protéolytique dans les filtrats de culture de Foa. Celle ci est maximale à pH 6. L'utilisation de quelques inhibiteurs, nous a montré qu'il pourrait s'agir d'un mélange de métalloprotéases et de thiols protéases, comme c'est le cas pour les protéases de *Phascolomyces articulatus* (1). Bien que cette activité soit de loin plus faible que l'activité pectinolytique ; elle pourrait jouer un rôle important dans la toxicité du champignon en dégradant les protéines fonctionnelles ou de structure de la plante. Cette hypothèse a été déjà avancée par Clerivet (5) qui avait suggéré que les protéases extracellulaires de *Cladosporium cucumerinum*, permettent au champignon de détruire les protéines pariétales des cellules végétales, en libérant ainsi, les nutriments indispensables à sa croissance. Ces protéases acides pourraient également jouer un rôle particulier, en ouvrant la voie à d'autres enzymes telles que les pectinases. Toutes ces hypothèses, relatives aux rôles des enzymes sécrétées sont en accord avec celles émises par Murata et al., (17) qui ont relié la pathogénéicité des bactéries à leur capacité de produire des enzymes extracellulaires telles que les pectinases, cellulases et protéases.

Remerciements

Nous remercions Pr.H.B.Lazrek (Faculté des Sciences Marrakech-Maroc) pour ces remarques précieuses et suggestions enrichissantes. Nos remerciements vont également aux techniciens du Laboratoire de Biochimie de la Faculté des Sciences de Marrakech et du Laboratoire de Phytopathologie Génétique et Lutte Intégrée de l'INRA de Marrakech. Nous tenons à remercier également Pr. Burkard de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP-CNRS) de Strasbourg pour son aide à la fois scientifique et matérielle.

Références bibliographique

- Balasubramanian, R. and Manocha, M.S. (1986). Cysteine proteinase of *Phascolomyces articulatus*: Purification and properties. *Can.J.Bot.* 64, 2441-2445.
- Baracat, M.S., Bertran, R.E., Ride, J.P. (1989). Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiol Mol Plant Pathol*, 34, 3-12.
- Belarbi -Halli., R., Dexheimer., J., Mangenot, F. (1984). Le pneumatode chez phoenix dactyliféra. II Ultrastructure de la paroi de la cellule aëriifère chez Des pneumatodes jeunes provenant de cultures axéniques. *Can.J.Bot.* 62, 972-981.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein -dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Clerivet, A. (1989). Activités protéolytiques, pectinolytiques et cellulolytiques de *stemphylium floredanum* Hannon et Weber cultivé sur feuilles de salaum gilo Raddli. *C.R Acad.Sci. Paris*, t 309, serie III. 661-668.
- Cooper, R.M., Rankin, B. and Wood, R.K.S. (1978). Cell wall degrading enzymes of vascular wilt fungi. Properties and modes of action of polysaccharides of *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycoprsici* *Physiol plant pathol.* 13, 101-134.

- Deese , D.C.and Stahmann , M.A. (1962) (a). Pectic enzymes and cellulase formation by *Fusarium oxysporum* f.sp *cubens* on stem tissue from resistant and susceptible banana plants. *Phytopathology* , 52,247-255.
- Deese , D.C.and Stahmann , M.A. (1962) (b). Pectic enzymes in *Fusarium* infected susceptible and resistant tomato plants. *Phytopathology* , 52,255-260.
- DiPietro A., Lorito, M.,Hayes, C.K, Broadway, R.M. and Harman,G.E. (1996). Endochitinase from *Gliocladium virens* :Isolation,Characterization,and Synergic Antifungal Activity in Combination with Gliotoxin. *Molecular Plant Pathology*, 83, No3, 308313 .
- Dubost, D. Kechacha ,L. et Rether ,R. (1970). Etude des enzymes pectinolytiques et cellulolytiques d'une souche monospore du *Fusarium oxysporum* fsp *albedinis* (Kill et Maire) Malençon. *Al Awamia* ,35,196-211.
- Enokibara ,S. ,Mori , N. and Kitamoto ,Y .(1992).Purification and some properties of a carboxyl methyl cellulase from *Favolus arcularius* . *Journal of Fermentation and Bioengineering* , 73, 230-232.
- Goyal, A., Ghosh, B. and Eveleigh, D .(1991).Characteristics of fungal cellulase.*Bioresource technology* ,36, 37-50.
- Hussain ,A. and Dimond ,A.E .(1960). Rôle of cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* . *Phytopathology* , 50, 329-331.
- Laemmeli ,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* .277.377-385.
- Meyer, J.A .(1967). Recherche sur les fusarioses . II Ecologie et pathogénie du "*Fusarium oxysporum*" .*Ann Epiphyties* , 18,241-247.
- Miller ,G.L .(1959).Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of sugar . *Anal.Chem*,31,426-428.
- Murata,H., Mc Evoy, J.L., Chattejee,A., Collmen,C. and Chatterjee, A.K. (1991).Molecular cloning of an aep A Gene that activittates production of extracellular pectolytic , cellulolytic and proteolytic enzymes in *Erwinia carotovora subsp carotovora* *Molecular Plan-Microbe interactions* ,4,239-246.
- Ortega,J. (1990).Production of extracellular cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* .*The Texas journal of science*, 42,405-409.
- Paquin, R and Coulombe L.J. (1962). Pectic enzymes synthesis in relation to virulence in *Fusarium oxysporum* (Sacc/Snyder and Hasen.Can.J.Bot.40,533-541.) in Meyer,J.A and Renard J.L. (1969).Protein and Esterase Patterns of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*.*Phytopathology*, 59, 1409-1411.
- Perez-Artes , E.and Tena, M. (1989).Pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceri* enzymes production in culture and enzymatic activity on isolated chick pea cell walls . *Phytopathology* 124,33-51.
- Sedra My.H. 1993. Remarques sur le pouvoir pathogène des isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, agent de la fusariose vasculaire (Bayoud) de palmier dattier. *Al Awamia* 83,